



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Pediatria

Estado da Arte da Terapêutica da Síndrome Crigler-Najjar Tipo 1

Ana Sofia Afonso Domingos

JUNHO'2020



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Pediatria

Estado da Arte da Terapêutica da Síndrome Crigler-Najjar Tipo 1

Ana Sofia Afonso Domingos

Orientado por:

Dr^a Cristina Campos Gonçalves

JUNHO'2020

Resumo

A síndrome Crigler-Najjar tipo 1 (SCN1) é uma doença rara caracterizada por uma hiperbilirrubinemia não conjugada grave desde o nascimento. Esta doença é causada pela ausência da atividade da enzima *uridine diphosphate-5'-glucuronosyltransferase type 1* (UGT1A1), essencial para a conjugação e excreção da bilirrubina. Estes doentes têm um risco elevado de desenvolver *kernicterus* pela acumulação de bilirrubina não conjugada no sistema nervoso central, nomeadamente nos núcleos da base. Apesar da fototerapia ser eficaz na redução dos níveis séricos de bilirrubina, esta torna-se menos eficaz na adolescência, aumentando o risco nesta fase. Atualmente, o transplante hepático é o único tratamento com potencial curativo para esta síndrome. No entanto, apresenta desvantagens como o custo, a disponibilidade limitada de dadores, a imunossupressão prolongada e o potencial de rejeição do enxerto.

O transplante de hepatócitos é uma alternativa terapêutica menos invasiva. Todavia, este procedimento tem um efeito terapêutico transitório e, requer igualmente dadores e terapêutica imunossupressora prolongada. Desta forma, a exploração de estratégias terapêuticas alternativas para esta doença é necessária, destacando-se o transplante de células estaminais e a terapia génica.

O crescente interesse nas células estaminais é baseado no seu potencial de se diferenciarem em hepatócitos que são posteriormente infundidos no fígado do doente para corrigir o defeito metabólico. Na terapia génica, o gene deficiente é substituído por um normal, permitindo a produção da enzima UGT1A1 e, conseqüentemente, a prevenção da progressão da doença. Nos últimos anos foram desenvolvidas várias estratégias de terapia génica no modelo animal da SCN1, o rato Gunn, através da utilização de vetores virais e não virais. A terapia génica pode ser permanente, alcançando a cura desta doença. Ainda assim, neste momento, algumas adversidades como a segurança a longo prazo e a toxicidade associada ao vetor utilizado, limitam a sua aplicação clínica no humano.

Palavras-chave: Síndrome Crigler-Najjar tipo 1, Transplante hepático, Fototerapia, Transplante de hepatócitos, Transplante de células estaminais, Terapia génica.

“O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML”

Abstract

Crigler-Najjar syndrome type 1 (SCN1) is a rare disease characterized by a severe unconjugated hyperbilirubinemia since birth. This disease is caused by a complete deficiency of the activity of uridine diphosphate-5'-glucuronosyltransferase type 1 (UGT1A1), which is essential for the conjugation and excretion of bilirubin. Because of the accumulation of unconjugated bilirubin in plasma, patients are at risk for kernicterus. Although phototherapy successfully reduces serum bilirubin levels, patients are again at increased risk for kernicterus around the time of adolescence, when phototherapy becomes less effective. Currently, liver transplantation is the only definitive treatment for SCN1. However, this therapy has drawbacks such as cost, limited availability of donors, prolonged immunosuppression, and potential for graft rejection.

Hepatocyte transplantation is a less invasive alternative to liver transplantation. However, this procedure has a transient therapeutic effect and, immunosuppressive therapy and donor livers are still required. These considerations prompt the exploration of alternative treatment strategies for the disease, such as stem cell transplantation and gene therapy.

The increasing interest in stem cells is based on their potential ability to differentiate into hepatocyte like cells and be infused in the recipient's liver to bring a missing metabolic function. In gene therapy, the defective gene is replaced with a normal gene to enable the production of the active enzyme and prevent the development and progression of the disease. In the last years, several strategies of gene transfer, using viral and non-viral vectors, have been developed in the animal model of SCN1, the Gunn rat. Gene therapy could be permanent, leading to life-long cure of the disease. However, at the moment, some adversities such as long-term safety and vector toxicity, limit its clinical application in humans.

Keywords: Crigler-Najjar syndrome type 1, Liver transplantation, Phototherapy, Hepatocyte transplantation, Stem cell transplantation, Gene therapy.

“The Final Work expresses the author's opinion, not FMUL's”

Índice

1. Introdução.....	1
2. Síndrome Crigler-Najjar.....	2
3. Alternativas Terapêuticas.....	4
3.1 Fototerapia.....	5
3.2 Transplante Hepático	6
3.2.1 Transplante Hepático Ortotópico.....	7
3.2.2 Transplante Hepático Auxiliar	10
3.2.3 Transplante Hepático em Dominó.....	12
3.3 Transplante de Hepatócitos	13
3.4 Transplante de Células Estaminais	16
3.5 Terapia Génica.....	20
4. Conclusão	28
Agradecimentos	30
Bibliografia.....	31

1. Introdução

A síndrome Crigler-Najjar (SCN) é uma doença genética rara caracterizada por uma hiperbilirrubinémia não conjugada desde o nascimento. Existem duas apresentações distintas da doença, a SCN tipo 1 (SCN1) e a SCN tipo 2 (SCN2).

A SCN1 é caracterizada por uma deficiência completa da enzima *uridine diphosphate-5'-glucuronosyltransferase type 1* (UGT1A1) com consequente ausência total da glucuronidação da bilirrubina. Esta doença pode ser fatal pela presença de uma hiperbilirrubinémia não conjugada permanente e grave associada a *kernicterus*.

Os doentes com SCN2 têm uma atividade da UGT1A1 residual resultando num fenótipo mais ligeiro. Estes doentes mantêm a capacidade de conjugar e excretar a bilirrubina através da bÍlis. Os doentes com SCN2 podem ser tratados com fenobarbital, que aumenta a atividade residual da UGT1A1, diminuindo as concentrações séricas de bilirrubina não conjugada em aproximadamente 30%.

O transplante hepático continua a ser o único tratamento definitivo para esta síndrome. No entanto, as complicações associadas, o custo, a disponibilidade limitada de dadores e a necessidade de imunossupressão prolongada limitam a sua realização numa fase precoce do curso da doença. Por este motivo, a fototerapia constitui o tratamento de rotina de todos os doentes com SCN1 através da diminuição dos níveis de bilirrubina não conjugada até ao momento do transplante hepático, permitindo o prolongamento da sobrevivência dos doentes sem défices neurológicos associados. Porém, esta terapêutica torna-se cada vez menos eficaz com a idade e, eventualmente, falha na prevenção das lesões cerebrais induzidas pelo excesso de bilirrubina. Esta situação motivou o desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas para o tratamento da hiperbilirrubinémia não conjugada grave. O tratamento da SNC1 evoluiu com o aparecimento de modalidades terapêuticas como o transplante de hepatócitos e o transplante de células estaminais. Recentemente, a investigação tem-se concentrado no estudo da terapia génica como uma possibilidade terapêutica para os doentes com SCN1.

O objetivo desta revisão é a apresentação do estado da arte do tratamento da SCN1, fornecer uma perspetiva atual das opções terapêuticas reais, apresentar as vantagens e desvantagens das mesmas, bem como perspetivar terapêuticas futuras que se encontram em estudo.

2. Síndrome Crigler-Najjar

A SCN foi descrita, pela primeira vez em 6 doentes, em 1952 pelo Dr. John Crigler e pelo Dr. Victor Najjar (Van Dijk et al., 2015). É uma doença genética rara do metabolismo da bilirrubina, com uma incidência de cerca de 1 caso por 1000000 nascimentos, caracterizada por uma hiperbilirrubinémia não conjugada gerada por um défice da atividade da enzima UGT1A1. Foram identificadas mais de 130 mutações no gene UGT1A1 responsáveis pela SCN, sendo que a variante genética mais frequente é a repetição da sequência de aminoácidos TA na região 53 do promotor deste gene (Ebrahimi & Rahim, 2017).

Em 1969 foram descritos 2 tipos de SCN reconhecidos, a SCN tipo 1 (SCN1) e a SCN tipo 2 (SCN2), de acordo com a atividade residual da UGT1A1 e da sua indução após exposição ao fenobarbital. Na SCN1 existe uma deficiência total da enzima UGT1A1 e consequente ausência da glucuronidação hepática da bilirrubina, ao passo que na SCN2 existe uma atividade da enzima de 4 a 10%. Por outro lado, o fenobarbital não tem efeito na SCN1, uma vez que há uma perda completa da atividade da enzima. No entanto, é uma opção terapêutica na SCN2, pois nesse caso há a preservação de alguma atividade da UGT1A1 que pode ser ativada (H. L. Chen et al., 2018). Estes fatores também permitem distinguir a SCN da síndrome de Gilbert (também denominada de SCN tipo 3), na qual existe uma atividade da UGT1A1 de cerca de 20 a 30% (Dhawan et al., 2019).

O controlo ineficaz dos níveis de bilirrubina sérica nesta doença, pode resultar em hiperbilirrubinémia não conjugada grave e persistente. As concentrações elevadas de bilirrubina não conjugada, podem atravessar a barreira hematoencefálica, promovendo o aparecimento de uma encefalopatia bilirrubínica grave denominada *kernicterus* (lesão cerebral e sequelas neurológicas desencadeadas pela deposição de bilirrubina não conjugada nos nervos cranianos, núcleos subtalâmicos, gânglios da base e no hipocampo) (Shi et al., 2019). Os efeitos da toxicidade da bilirrubina no sistema nervoso central são devastadores e irreversíveis e podem manifestar-se desde o nascimento. O *kernicterus* manifesta-se, precocemente, por letargia, diminuição da sucção durante o aleitamento, choro agudo e hipotonia e, tardiamente, por irritabilidade, hipertonia, convulsões, apneia,

opistótonos e febre. Cronicamente, ocorre perda de audição, displasia do esmalte, atraso do desenvolvimento psicomotor e coreoatetose (Karimzadeh et al., 2020).

A SCN1 é uma patologia autossômica recessiva caracterizada por uma bilirrubina sérica entre 20 a 25 mg/dL podendo atingir valores até 50 mg/dL. A SCN1 está associada a uma icterícia importante e persistente com risco elevado de complicações neurológicas se não for tratada (Fagiuoli et al., 2013).

O diagnóstico da SCN é realizado através da história clínica, do exame objetivo e de análises laboratoriais. Devemos suspeitar de SCN na presença de uma icterícia persistente, que surge nas primeiras 24 horas de vida ou após a primeira semana, acompanhada de uma hiperbilirrubinemia não conjugada acentuada com uma elevação da bilirrubina superior ou igual a 0.5 mg/dL/h. Habitualmente, os recém-nascidos apresentam outros sintomas concomitantes como vômitos, problemas na alimentação e perda ponderal excessiva. Estas particularidades contrastam com a icterícia fisiológica do recém-nascido que surge após as primeiras 24 horas de vida. Esta entidade é caracterizada por uma hiperbilirrubinemia não conjugada ligeira, elevação da bilirrubina inferior a 0.5 mg/dL/h, duração inferior a uma semana no recém-nascido de termo e duas semanas no prematuro e normalmente não apresenta sintomas concomitantes. Devemos igualmente excluir a icterícia do aleitamento materno que se define pela persistência da icterícia fisiológica para além da primeira semana e é frequente nos recém-nascidos com aleitamento materno exclusivo. Neste contexto, a icterícia pode surgir ligeiramente mais tarde, entre o terceiro e o quinto dias de vida e pode prolongar-se até às 12 semanas (Guerrero-Fernández et al., 2018).

Na SCN, a avaliação analítica revela habitualmente níveis elevados de bilirrubina total sérica, à custa da fração não conjugada (bilirrubina total superior ou igual a 12 mg/dL com fração conjugada inferior a 0.5 mg/dL), na ausência de sinais de hemólise. Na análise dos pigmentos biliares, a bÍlis tem somente vestÍgios de bilirrubina conjugada, 2 a 25% de monoconjugados e mais de 75% de bilirrubina não conjugada. O diagnóstico definitivo pode ser baseado na demonstração da deficiência enzimática no fÍgado, após biÓpsia hepática. No entanto, o diagnóstico é geralmente confirmado pela análise do gene UGT1A1, excluindo a necessidade da biÓpsia (Ambrosino et al., 2005).

3. Alternativas Terapêuticas

Atualmente, a terapêutica desta doença inclui: plasmaferese no tratamento emergente no período neonatal (esta abordagem é eficaz na diminuição rápida das concentrações séricas de bilirrubina. No entanto, foi associada a complicações consideráveis como trombocitopenia, trombose da veia porta, enterocolite necrotizante e sépsis); fototerapia diária; albumina durante as exacerbações; e o transplante hepático (Dhawan et al., 2019). A distribuição da bilirrubina não conjugada entre os compartimentos intra e extravascular é um determinante crítico na potencial toxicidade da mesma e depende da interação entre a bilirrubina e a albumina. Mais de 99% da bilirrubina não conjugada intravascular está ligada à albumina e interage pouco com o endotélio cerebral. Por outro lado, a bilirrubina livre atravessa a barreira hematoencefálica e deposita-se no cérebro e noutros tecidos extravasculares (Strauss et al., 2019). A albumina diminui 10 a 40% em resposta a estímulos inflamatórios, pelo que durante intercorrências infecciosas, os doentes com SCN1 experienciam uma subida de 25 a 50% da bilirrubina total acompanhada de hipoalbuminémia. Assim, estes doentes são submetidos a infusões intravenosas de albumina durante as exacerbações graves (a albumina promove a mobilização da bilirrubina dos tecidos, como o sistema nervoso central, para a circulação). Alguns fármacos administrados durante as intercorrências têm igualmente o potencial de precipitar *kernicterus* (o sulfisoxazol desloca a bilirrubina do compartimento intravascular para o extravascular agravando a lesão cerebral e aumentando a mortalidade nestes doentes). Muitos antibióticos e contrastes endovenosos interferem com a ligação da bilirrubina à albumina e podem precipitar lesão neurológica em qualquer doente ictérico (Strauss et al., 2019), devendo a administração de fármacos ser cautelosa nestes doentes.

Existem ainda outros agentes farmacológicos úteis tais como: fenobarbital (agente indutor da enzima UGT1A1); fosfato de cálcio e orlistat (formam complexos com a bilirrubina no intestino impedindo a sua reabsorção); ursodiol (colerético); protoporfirina de zinco (inibidor da oxigenase do grupo hemo que promove a redução temporária dos níveis de bilirrubina sérica). No entanto, a evidência da eficácia destes últimos agentes é limitada e é difícil tirar conclusões pela alta variabilidade inter e intra-individual. O fenobarbital tem alguma eficácia nos doentes com SCN2 e, tal como foi referido

anteriormente, pode ser usado para diferenciar entre a SCN1 e a SCN2 (Strauss et al., 2006).

3.1 Fototerapia

Em 1950 constatou-se que a exposição solar reduzia a hiperbilirrubinemia nos recém-nascidos. Isto acontecia pela formação de isômeros mais polares, induzida pela radiação ultravioleta, facilmente excretáveis através da urina e da bÍlis. Esta descoberta permitiu o advento da fototerapia, entre 1958 e 1968, que atualmente permite aos doentes atingirem a idade adulta sem danos neurológicos (Van Dijk et al., 2015).

Antes da utilização da fototerapia, as crianças com SCN1 morriam precocemente de *kernicterus* ou sobreviviam até ao início da idade adulta, embora com lesões neurológicas graves. A fototerapia alterou a história natural da SCN permitindo um prolongamento da sobrevivência sem défices neurológicos (Strauss et al., 2006).

A fototerapia baseia-se na interação entre a radiação eletromagnética da luz e os tecidos biológicos e constitui o principal tratamento para a SCN1 antes da realização do transplante hepático. Existem 2 sistemas de fototerapia: *laser* e *light-emitting diode* (LED). No primeiro, os recém-nascidos recebem 15 a 20 horas diárias em 60 a 70% da superfície corporal com a fonte de luz posicionada a 30 a 45 cm da pele. Em crianças mais velhas e adultos, a fonte de luz é posta a 45 a 60 cm da pele e entregue durante a noite em 35 a 50% da superfície corporal. Os aparelhos do *laser* são grandes, rígidos, pesados e utilizam uma fonte de luz que deteriora rapidamente com a sua utilização (Strauss et al., 2019). Para além disso, este tratamento tem a desvantagem de expor os doentes a radiação ultravioleta (Strauss et al., 2006). A utilização de LED tem a vantagem de poder ser ajustada ao nível de tratamento pretendido e não expor os doentes a radiação ultravioleta (Schauer et al., 2002). O LED demonstrou ser 44 a 109% mais potente que o *laser* permitindo um controlo mais rigoroso dos níveis séricos de bilirrubina total. Os aparelhos do LED requerem menos manutenção, são mais leves, mais frios, portáteis e adaptam-se ao tamanho do doente (Strauss et al., 2019).

O tratamento com fototerapia na SCN1 deve ter uma duração de pelo menos 12 horas diárias com o objetivo de manter os níveis de bilirrubina sérica abaixo dos limites neurotóxicos. Estes valores são definidos como uma bilirrubina total igual ou superior a

30 mg/dL e um rácio bilirrubina total/albumina igual ou superior a 1 mol/mol. Estes limites são preditivos de *kernicterus* e os doentes que não iniciam a fototerapia após os 13 dias de vida, são 3.5 vezes mais suscetíveis a sofrer lesão cerebral. Para proteger os doentes contra esta toxicidade, a bilirrubina total deve ser mantida abaixo dos 20 mg/dL e o rácio bilirrubina/albumina inferior a 0.7 mol/mol (Strauss et al., 2019).

A maioria dos doentes realiza o tratamento durante a noite e há evidências que isso não interfere com a produção rítmica de melatonina e com o ritmo circadiano. No entanto, existem alguns inconvenientes consideráveis da fototerapia como a restrição de viagens, barreiras nas interações e oportunidades sociais, problemas do sono, necessidade de nudez durante o tratamento e dificuldades na manutenção da temperatura corporal. A fototerapia gera calor e os doentes, muitas vezes, requerem sistemas de arrefecimento noturno como ar condicionado ou ventoinhas elétricas. A fototerapia também está associada a alguns efeitos adversos como a hiperqueratose, rash cutâneo, dermatose bolhosa, diarreia e desidratação (Dhawan et al., 2019).

Na adolescência, o aumento do peso, pigmentação e espessura da pele tornam a fototerapia menos eficaz, aumentando o risco de *kernicterus*. Há evidências que apesar da fototerapia, a bilirrubina aumenta cerca de 0.8 mg/dL/ano com o avançar da idade (Dhawan et al., 2019). Para além disso, esta técnica foi associada a restrições do desenvolvimento educacional e social das crianças e apesar da fototerapia agressiva, as crianças desenvolvem inevitavelmente danos neurológicos pela diminuição da tolerância a este tratamento com a idade. Isto é uma das principais razões pela qual os adolescentes e adultos com SCN1 requerem transplante hepático (Schauer et al., 2002).

3.2 Transplante Hepático

Existem 2 tipos principais de transplante hepático usados em doentes com SCN: o transplante hepático ortotópico (OLT - *Orthotopic Liver Transplant*) e o transplante hepático auxiliar (ALT - *Auxiliary Liver Transplantation*). No OLT, o fígado do doente é substituído pelo fígado de um dador. No ALT, parte do fígado do doente é deixado no local e é suportado por um enxerto hepático de um dador (Shanmugam et al., 2011).

A escassez de dadores para transplante estimulou o desenvolvimento de várias alternativas para reforçar o suprimento de órgãos disponíveis. Uma estratégia

particularmente inovadora é o transplante hepático em dominó (DLT – *Domino Liver Transplantation*). Esta abordagem envolve o transplante hepático de um doente com uma doença metabólica específica para um doente com uma doença hepática terminal (Celik et al., 2019).

Nas secções seguintes serão descritas, de forma mais detalhada, estas 3 modalidades de transplante hepático.

3.2.1 Transplante Hepático Ortotópico

Atualmente, o transplante hepático ortotópico (OLT - *Orthotopic Liver Transplant*) é o único tratamento definitivo para a SCN1. No OLT todo o fígado nativo é substituído por um enxerto hepático total ou parcial de um dador alogénico vivo ou cadáver. O transplante de dador vivo é adequado quando existe pouca disponibilidade de órgãos ou em sociedades nas quais a transplantação de dador cadáver é culturalmente inaceitável (Strauss et al., 2019).

Está recomendado para crianças com SCN1 com hiperbilirrubinémia não conjugada grave que não respondem às restantes terapêuticas ou que têm progressão dos sintomas neurológicos. A determinação do momento correto para a sua realização permanece ainda um desafio. No entanto, é consensual que deve ser efetuado como um procedimento preventivo, previamente ao desenvolvimento de lesões neurológicas, com o menor risco associado possível. Todavia, o início das alterações neurológicas é imprevisível, sugerindo a realização do transplante o mais cedo possível. Se o *kernicterus* se desenvolve e as lesões neurológicas se tornam irreversíveis, o transplante deixa de ter uma indicação formal. Porém, indivíduos com danos neurológicos moderados podem melhorar substancialmente se a fototerapia for intensificada no período pré-transplante (Schauer et al., 2002).

Foi realizado um estudo em 2003 (Schauer et al., 2003), no qual participaram 3 doentes, um com 4 anos (doente 1) sem alterações neurológicas, um de 7 anos (doente 2) com alterações neurológicas ligeiras e outro com 12 anos (doente 3) com alterações neurológicas moderadas. As alterações neurológicas incluíam perturbação do desenvolvimento intelectual nos doentes 2 e 3 e apatia e alterações do discurso no doente 3. A indicação para transplante hepático nos doentes 2 e 3 foi baseada no início dos

défices neurológicos reversíveis, enquanto que no doente 1 foi fundamentado na evolução clínica expectável, funcionando como um procedimento preventivo. Os doentes foram submetidos a imunossupressão com ciclosporina ou tacrolimus e corticosteroides. Como complicações, os doentes tiveram apenas episódios *minor* de rejeição celular, nas primeiras semanas pós-transplante, tratados com corticosteroides. No doente 1, a bilirrubina sérica normalizou nas primeiras duas semanas após o transplante, com uma bilirrubina total final de 18.8 $\mu\text{mol/L}$ e uma taxa de bilirrubina conjugada correspondente de 85% (bilirrubina pré-OLT de 308-513 $\mu\text{mol/L}$). No doente 2, a bilirrubina sérica normalizou em 12 dias, com uma bilirrubina total final de 18.8 $\mu\text{mol/L}$ e uma fração conjugada de 13.4 $\mu\text{mol/L}$ (bilirrubina pré-OLT de 340-430 $\mu\text{mol/L}$). No doente 3, a bilirrubina sérica normalizou após duas semanas do transplante, com uma bilirrubina total final de 18.8 $\mu\text{mol/L}$ e 90% de taxa de bilirrubina conjugada (bilirrubina pré-OLT de 340-600 $\mu\text{mol/L}$). Após um follow-up de 27 a 36 meses, a bilirrubina sérica era de 12, 13.7 e 17.1 $\mu\text{mol/L}$ nos doentes 1, 2 e 3 respetivamente. O doente 1 teve um desenvolvimento psicomotor e crescimento normal, antes e após o transplante e frequentou a escola no ano adequado à sua idade. Os doentes 2 e 3 sofreram uma melhoria substancial do atraso do desenvolvimento psicomotor prévio e também foram para a escola no ano apropriado.

O transplante permite, assim, uma atividade da enzima de quase 100%, reduz a bilirrubina total para valores normais e é decisivo na prevenção de *kernicterus* (Strauss et al., 2019).

O transplante hepático oferece a cura para a SCN1 e diminuiu drasticamente a mortalidade atribuída a esta doença. Strauss et al. (Strauss et al., 2006) demonstraram uma sobrevivência de 100% em doentes seguidos durante 16 anos e Vand der Veere et al. (Van der Veere et al., 1996) comprovaram uma sobrevivência de 91% num seguimento de 28 anos.

No entanto, esta abordagem terapêutica não é totalmente desprovida de complicações. A substituição de um fígado estruturalmente normal, apenas pelo défice funcional de uma única enzima, pode ser considerado um tratamento excessivo. Existem vários estudos que comprovam que apenas 2% dos hepatócitos são estritamente necessários para a conjugação adequada da bilirrubina e apenas 5 a 10% da atividade da UGT1A1 é suficiente para reduzir a bilirrubina sérica para níveis abaixo dos responsáveis pelos danos cerebrais (Oishi et al., 2017). Além disso, a realização do transplante hepático

num contexto onde existem outras alternativas terapêuticas, como é o caso da SCN, levanta outro problema ético, visto que são utilizados recursos que, para outras situações clínicas, podem ser o único tratamento disponível.

Após o transplante hepático, os doentes devem ser submetidos a terapêutica imunossupressora vitalícia (um dos esquemas mais frequentemente utilizados é a combinação de tacrolimus ou ciclosporina com corticosteroides) para prevenir uma eventual rejeição do enxerto. As principais complicações da imunossupressão são as infecções oportunistas como a infecção por citomegalovírus e a virémia a Epstein-Barr associada a doença linfoproliferativa. É também fundamental a realização de profilaxia antibiótica nos primeiros 6 meses do pós-transplante, com cotrimoxazol, para prevenir a pneumonia por *pneumocystis carinii* (Strauss et al., 2006).

As principais limitações do transplante incluem a natureza invasiva do procedimento, o custo, a disponibilidade limitada de dadores, a falência do enxerto e os efeitos adversos da imunossupressão referidos anteriormente. Entre 14 a 67% dos doentes com SCN1 submetidos a OLT apresentam uma ou mais complicações significativas como obstrução biliar, oclusão intestinal ou derrame pleural. Além disso, os doentes submetidos a transplante ainda apresentam a mutação no gene UGT1A1 e, podem por isso, transmiti-la aos filhos (Dhawan et al., 2019).

Por outro lado, no caso dos doentes com SCN1 com alterações neurológicas já estabelecidas, apenas 36% demonstraram uma melhoria importante dos sintomas após o transplante. Esta baixa percentagem deve-se, provavelmente, à realização tardia do transplante (Schauer et al., 2003). Apesar do ideal ser tentar adiar, o máximo possível, a realização do transplante e a exposição das crianças a fármacos imunossupressores, deve considerar-se que o controlo desta doença torna-se cada vez menos eficaz ao longo do tempo, aumentando o risco de *kernicterus*. Para além disto, a inconsistência familiar na adesão à terapêutica com fototerapia e as complicações referidas anteriormente, permanecem como grandes ameaças à integridade neurológica dos doentes com SCN1 (Fagiuoli et al., 2013).

Uma desvantagem do OLT prende-se com a impossibilidade de realização de futuras terapias génicas dirigidas aos hepatócitos nativos, como a substituição génica e a edição do genoma (Dhawan et al., 2019). Estas evidências levaram à procura de novas alternativas terapêuticas, como o transplante de hepatócitos, o transplante de células

estaminais e a terapia génica, com o intuito de adiar ou eventualmente evitar o transplante hepático. No entanto, o transplante hepático permanece a abordagem terapêutica mais adequada e custo-efetiva para as doenças hepáticas metabólicas, como a SCN1 (Oishi et al., 2017).

3.2.2 Transplante Hepático Auxiliar

O transplante hepático auxiliar é uma técnica na qual um segmento hepático de um dador é colocado ao lado do fígado nativo. Pode ser realizado sem a resseção do fígado nativo, denominando-se heterotópico, ou com a resseção de parte do fígado nativo, designando-se ortotópico (APOLT - *Auxiliary Partial Orthotopic Liver Transplantation*). O transplante auxiliar heterotópico é raramente utilizado pela dificuldade técnica e pelas complicações associadas. Deste modo, a maioria dos transplantes auxiliares realizados são ortotópicos (Shanmugam et al., 2011).

O APOLT é um procedimento no qual uma porção do fígado nativo, geralmente o segmento lateral esquerdo, é removido e substituído por um enxerto parcial, de tamanho correspondente, proveniente de um dador, permitindo a conjugação da bilirrubina. É um procedimento seguro em casos selecionados, de que são exemplo as doenças metabólicas hepáticas, com melhorias substanciais do desenvolvimento e estado neurológico destes doentes. Contrasta com o OLT, no qual o fígado é totalmente removido e substituído por um enxerto alogénico. O APOLT é primordialmente indicado em doenças metabólicas hepáticas não cirróticas com defeitos primários da expressão enzimática, como a SCN1. Tal como no caso do OLT, é fundamental realizar o transplante antes do estabelecimento da lesão neurológica permanente (Rela et al., 1999). O APOLT foi introduzido como uma alternativa terapêutica para a SCN1 com excelentes resultados. Contudo, ainda não foi implementado de forma expressiva em muitas instituições (Schauer et al., 2003).

A maioria das doenças metabólicas hepáticas precisa de uma pequena quantidade de atividade enzimática para ser assintomática (5 a 10% no caso da SCN1). Deste modo, a substituição hepática total não é necessária e um pequeno enxerto pode ser suficiente para corrigir estas doenças. Para além disso, os riscos intraoperatórios são drasticamente reduzidos, nomeadamente o stress cardíaco associado ao OLT (Shanmugam et al., 2018).

O conceito de transplante auxiliar nas doenças metabólicas, como a SCN1, é providenciar células exógenas capazes de corrigir o defeito metabólico, enquanto que as células nativas continuam a realizar as restantes funções hepáticas. Nesse sentido, o transplante auxiliar pode ser considerado uma forma de terapia génica nas doenças metabólicas (Shanmugam et al., 2011). É importante salientar, que a maioria dos doentes submetidos a transplante hepático em doenças metabólicas hepáticas, são crianças pequenas que, no caso do APOLT, irão beneficiar de uma vida sem imunossuppressores quando forem adultas, se a terapia génica se tornar disponível. Deste modo, uma das grandes utilidades deste tipo de transplante é a preservação de parte do fígado nativo para futura terapia génica (Shanmugam et al., 2018).

Foi reportado um caso clínico em 2011 (Shanmugam et al., 2011) de uma doente de 22 anos com SCN1. Esta doente foi submetida a APOLT, por manutenção dos valores de bilirrubina entre 26 a 28 mg/dL com fração conjugada de 0.5 mg/dL, apesar da realização de 8 a 10 horas diárias de fototerapia. Foi realizada uma hepatectomia lateral esquerda com excisão do lobo caudado e transplante dos segmentos 2 e 3 de um dador vivo. A recuperação realizou-se sem complicações. Os níveis de bilirrubina normalizaram 5 dias após o transplante e, à data, a doente apresentava análises hepáticas normais e melhoria da qualidade de vida.

As principais complicações desta abordagem terapêutica são a necessidade de imunossupressão, a disfunção precoce do enxerto e a atrofia do mesmo a longo prazo, pelo que é crucial que tanto o fígado nativo como o enxerto tenham um fluxo portal adequado. Entre 40 a 83% dos doentes com SCN submetidos a APOLT experienciou complicações, das quais se destaca a atrofia do enxerto (Dhawan et al., 2019). Porém, tais obstáculos tornaram-se desprezíveis com o aperfeiçoamento da técnica cirúrgica e da modulação do fluxo portal durante o período intraoperatório (Shanmuham et al., 2018).

Sze et al. (Sze et al., 2009) demonstraram que a sobrevivência do enxerto é semelhante entre o APOLT e o OLT (93 *versus* 100%, 70 *versus* 100% e 70 *versus* 75% aos 1, 5 e 7 anos respetivamente, $P=0.12$), assim como a sobrevivência do doente (100 *versus* 100%, 90 *versus* 100% e 90 *versus* 75% aos 1, 5 e 7 anos respetivamente, $P=0.87$).

No entanto, apesar das vantagens referidas acima, a utilização do APOLT nas doenças metabólicas como a SCN1 tem sido criticada pela complexidade da sua técnica cirúrgica e pela necessidade de imunossupressão (Rela et al., 1999).

3.2.3 Transplante Hepático em Dominó

O transplante hepático em dominó (DLT - *Domino Liver Transplantation*) é usado em doenças nas quais apenas uma enzima é deficiente, mas o fígado é estruturalmente normal. Esta técnica consiste no transplante hepático de um dador com uma doença metabólica específica para um doente com uma doença hepática em fase terminal. Esta abordagem pressupõe a expectativa que o doente não desenvolva manifestações do defeito enzimático do dador. O DLT tem sido usado para expandir o número de dadores disponíveis para transplante hepático. Vários DLT foram realizados com fígados de dadores com leucínose (MSUD - *maple syrup urine disease*). A MSUD é uma doença causada por um déficit no complexo enzimático responsável pela metabolização dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCKDH - *branched chain keto-acid dehydrogenase enzyme complex*). A acumulação neurotóxica destes aminoácidos pode ser responsável por edema cerebral, dano cerebral e morte. Os fígados de doentes com MSUD são excelentes candidatos para DLT porque a maioria da atividade do BCKDH é extra-hepática (Khanna et al., 2006).

Os autores Celik et al. (Celik et al., 2019) avaliaram os efeitos do DLT de doentes com MSUD em 2 doentes com SCN1, durante um tempo médio de follow-up de 1.6 anos. O primeiro caso, tratou-se de uma doente de 13 anos a realizar, antes do transplante, 9 a 11 horas diárias de fototerapia. Foi submetida a um DLT de um dador com MSUD em dezembro de 2015. Os valores de bilirrubina pré-transplante eram de 11 a 14.8 mg/dL e normalizaram 11 dias após o transplante. A doente não apresentou complicações *major* durante o pós-transplante e o perfil de aminoácidos era normal. À data, a doente encontra-se assintomática, sob imunossupressão e tem uma dieta sem restrições. O segundo caso, foi de uma doente de 20 anos a receber 8 horas diárias de fototerapia pré-transplante. Foi submetida a um DLT de um dador com MSUD em agosto de 2016. Os valores de bilirrubina antes do transplante variavam de 17.4 a 19.4 mg/dL e normalizaram após 12 dias do transplante. Tal como o caso anterior, não foram registados problemas *major* no pós-transplante e o perfil de aminoácidos era normal. À data, encontra-se sem sintomas, sob imunossupressão e tem uma dieta normal. Não houve evidência da alteração do perfil de aminoácidos de cadeia ramificada nos 2 casos. Por outro lado, ambas as doentes

atingiram uma correção eficiente da hiperbilirrubinémia com um curso pós-transplante livre de complicações.

À data, não há relatos de casos de doença de novo associada ao DLT com fígados de doadores com MSUD. No entanto, é necessário um acompanhamento a longo prazo para esclarecer a eficácia final desta técnica e o impacto da mesma na qualidade de vida dos doentes (Celik et al., 2019).

3.3 Transplante de Hepatócitos

Os hepatócitos são a população celular predominante no fígado, tanto em número como em massa e, contribuem para a regeneração hepática através da sua proliferação e hipertrofia. Além disso, em resposta à lesão, os hepatócitos têm uma grande plasticidade e perdem as suas características maduras, adquirindo fenótipos de células estaminais progenitoras (Najimi et al., 2016).

O transplante de hepatócitos (LCT - *Liver Cell Transplantation*) é uma técnica mais segura e menos invasiva do que o OLT e o APOLT, constituindo uma alternativa adequada na SCN1. Esta técnica deve ser considerada em doentes com défices enzimáticos, sem defeitos estruturais hepáticos, para poupar o fígado nativo para eventual terapia génica e providenciar uma reserva hepática em caso de falha do enxerto (Ebrahimi & Rahim, 2017). Os hepatócitos são infundidos através de um cateter colocado na veia porta (a injeção intraparenquimatosa também foi testada com sucesso em modelos pré-clínicos) e, se as condições forem favoráveis, proliferam e restauram o defeito metabólico subjacente a longo prazo. A maioria dos transplantes de hepatócitos oferece cerca de 2 a 4 milhões de células para o fígado recipiente. Nem todas as células transplantadas têm a capacidade de enxertar, pois muitas delas ficam retidas nos sinusoides hepáticos e perdem-se antes de atravessar a barreira endotelial. Alguns fármacos, como os anti-inflamatórios não esteroides, a nitroglicerina, a prostaciclina e a radiação, atuam neste passo limitante através da abertura da barreira endotelial, potenciando o número de células capazes de enxertar (Sokal, 2014). As células usadas são isoladas de doadores cadáveres e a sua capacidade de enxertar depende de vários fatores como a história médica do dador, as condições de preservação e o procedimento de isolamento das mesmas. Adicionalmente, a disponibilidade limitada de doadores é um dos grandes

problemas do transplante de hepatócitos. No entanto, fígados afetados por trauma e de dadores vivos podem ser considerados para este procedimento (Najimi et al., 2016).

Esta técnica tem a vantagem de não impedir uma futura terapia génica e de não interferir com um transplante hepático subsequente. Porém, as infusões isoladas de hepatócitos não demonstraram ser suficientes para evitar o OLT e requerem igualmente dadores e terapêutica imunossupressora prolongada. Como referido anteriormente, 5 a 10% da atividade enzimática da UGT1A1 é necessária para normalizar os níveis de bilirrubina. Deste modo, serão necessárias múltiplas infusões para fornecer hepatócitos suficientes, no sentido de eliminar qualquer necessidade de fototerapia. No entanto, questiona-se se múltiplas infusões estarão ou não associadas a aumento do risco de rejeição do enxerto (Fox et al., 1998).

Imediatamente após o isolamento dos hepatócitos, a viabilidade e a diferenciação dos mesmos diminuem significativamente, o que diminui o nível de enxerto dos hepatócitos transplantados. A taxa de enxerto celular pode ser avaliada através da análise do tecido hepático e do sangue do recetor. Em modelos experimentais, as células podem ser rastreadas através de métodos imunológicos ou marcadores genéticos. O enxerto de células pode igualmente ser verificado, indiretamente, através da medição da enzima UGT1A1 do doente, ou da sua atividade no sangue ou no fígado, em diferentes momentos do pós-infusão. Uma forma mais praticável de avaliar a eficácia do transplante em doentes com SCN1 é através dos níveis de bilirrubina sérica (Najimi et al., 2016). Num estudo realizado em 1998 (Fox et al., 1998), verificou-se que a bÍlis pré-transplante continha predominantemente bilirrubina não conjugada e, após o transplante de hepatócitos, todas as amostras de bÍlis demonstraram a presença de bilirrubina conjugada. Por outro lado, antes do transplante, a atividade da enzima UGT1A1 era de 8 pmol/mg de proteína por hora e, 7 dias após o transplante, passou para 110 pmol/mg de proteína por hora. Conclui-se que a presença de atividade enzimática no fígado e de bilirrubina conjugada na bÍlis é uma evidência do correto enxerto dos hepatócitos transplantados.

Os hepatócitos frescos são os melhores candidatos para transplante e embora estejam dependentes da disponibilidade de dadores, a sua reconstituição *in vitro* pode melhorar a sua sobrevivência e qualidade funcional. Por este motivo, há uma necessidade crescente de aumentar a criopreservação de hepatócitos, por períodos cada vez maiores de tempo, para que possam ser usados frescos após alguns dias. Por este motivo, é essencial

conhecer os mecanismos de danificação dos hepatócitos congelados e prevenir a perda da sua função após a criopreservação (Dhawan et al., 2006). Os autores Najimi et al. realizaram um estudo (Najimi et al., 2016), no qual foram realizados 2 transplantes de hepatócitos frescos e criopreservados em 2 doentes com SCN1. Numa rapariga de 9 anos observou-se uma descida da bilirrubina sérica de 17.5 mg/dL para 13.6 mg/dL pós-infusão. Num rapaz de 1 ano constatou-se uma descida da bilirrubina de 17.6 mg/dL para 13.3 mg/dL pós-infusão. O horário da fototerapia de ambos os doentes foi encurtado de 10 para 8 horas. Infelizmente, os efeitos não permaneceram por um período superior a 6 meses e os 2 doentes foram submetidos a transplante hepático (Najimi et al., 2016). De facto, a maior limitação deste procedimento é a duração limitada dos efeitos, sendo o benefício perdido após um período que varia de poucos meses a um pouco mais de 1 ano, sendo o máximo 18 meses (Sokal, 2014).

As principais complicações associadas a esta técnica são a trombose da veia porta, a hipertensão portal, a hemorragia e o embolismo pulmonar. Estas complicações podem ser evitadas com uma seleção criteriosa dos candidatos e com a monitorização da pressão venosa portal e do fluxo sanguíneo durante as infusões (Najimi et al., 2016). Os efeitos adversos mais comuns são os efeitos da imunossupressão, como as infeções e as doenças linfoproliferativas pós-transplante relacionadas com o vírus Epstein-Barr (Sokal, 2014).

Outro problema comum desta abordagem terapêutica é o desapontamento dos pais após a correção apenas parcial da icterícia dos filhos, com aversão a posteriores infusões e requisição do transplante hepático. Deste modo, é fundamental informar previamente as famílias sobre o tempo necessário para o procedimento começar a dar resultados positivos e a quantidade aproximada de infusões necessárias para aliviar os sintomas e sinais da doença como a icterícia. Por outro lado, a rejeição dos hepatócitos transplantados é frequente no contexto de uma imunossupressão insuficiente. Assim, pela necessidade de realizar múltiplas infusões, é crucial preparar as famílias e assegurar uma imunossupressão adequada para a maior eficácia deste método a longo prazo (Ambrosino et al., 2005).

O transplante de hepatócitos tem uma eficácia moderada e transitória, tanto em modelos animais como em humanos. A utilização desta técnica é justificada pelo potencial de utilização de hepatócitos criopreservados, pelo seu carácter não invasivo e pela elevada segurança associada. Tais vantagens permitem atualmente que seja utilizada

como uma técnica a aplicar como ponte para o transplante hepático. Para melhorar a sua eficácia, devem-se aprimorar os protocolos de criopreservação dos hepatócitos e desenvolver novas fontes potenciais destas células. As novas estratégias estão a focar-se na preparação prévia do fígado recetor e no aumento da durabilidade das células transplantadas, como por exemplo, a combinação da isquémia portal regional transitória com a irradiação. No entanto, a implementação destes procedimentos para a aplicação clínica, ainda precisa de otimização. Os resultados do transplante de hepatócitos poderiam beneficiar de métodos de aperfeiçoamento da técnica de enxerto e da consequente repopulação do fígado. As células estaminais podem ser diferenciadas em todos os tipos de células hepáticas, são mais fáceis de criopreservar, têm capacidade proliferativa *in vitro* e *in vivo* e são menos imunogénicas. Por todos estes motivos, as células estaminais apresentam-se como uma solução para ultrapassar as limitações do transplante de hepatócitos (Vogel et al., 2014).

3.4 Transplante de Células Estaminais

Nos últimos anos foi realizada uma extensa pesquisa no desenvolvimento de fontes celulares alternativas para substituir os hepatócitos maduros. As células estaminais são fortes candidatas pela capacidade de proliferação bem documentada e pelas características de plasticidade. O crescente interesse nas células estaminais prende-se com o seu potencial de reparar e regenerar tecidos e órgãos. Cada órgão tem o seu reservatório de células estaminais que estão pré-definidas para se diferenciarem em células específicas daquele tecido. Apesar de serem detetadas células estaminais medulares em fígados doentes, também foram detetados hepatócitos maduros que adquiriram características de células estaminais em certas situações patológicas (Najimi et al., 2016). Para além disto, as células estaminais dos outros tecidos também se podem diferenciar em hepatócitos, tanto *in vitro* como *in vivo*. No tratamento das doenças metabólicas hepáticas, o transplante de células estaminais depende da capacidade destas células de se diferenciarem em hepatócitos, bem como da sua capacidade de providenciar a enzima em défice (Sokal, 2014).

Vários tipos de células estaminais foram utilizados para a substituição celular hepática. As *liver-derived stem cells* podem ser obtidas tanto a partir de células de fígados

fetais (hepatoblastos) como de adultos (células ovais). Pelo facto de serem bipotentes, são capazes de se diferenciar em hepatócitos ou em células dos ductos biliares. As células ovais desempenham um papel importante na regeneração hepática quando a capacidade de replicação dos hepatócitos está comprometida. Os hepatoblastos demonstraram *in vivo* a capacidade de enxerto e diferenciação em modelos animais. O grande entrave da utilização destas células é o seu número reduzido num fígado normal, tornando o seu isolamento e expansão desafiante e restringindo a sua aplicação (Nicolas et al., 2016).

As *bone marrow-derived stem cells* incluem as hematopoiéticas e as mesenquimatosas, sendo que as últimas têm maior potencial para a regeneração hepática. As células estaminais mesenquimatosas são multipotentes e existem na medula óssea e noutros órgãos e tecidos, como o tecido adiposo, facilmente acessível, podendo ser expandidas rapidamente em cultura. Para além disso, estas células têm propriedades imunossupressoras das células T, B e NK traduzindo-se clinicamente pela capacidade de induzir tolerância após o transplante. As *annex stem cells* são pluripotentes e são facilmente acessíveis através do tecido placentário, cordão umbilical e líquido amniótico. Para além disso, têm um alto potencial de diferenciação e proliferação e não formam teratomas e teratocarcinomas no humano (Nicolas et al., 2016).

As *embryonic stem cells* (ESC) são totipotentes, podendo diferenciar-se em células *hepatocyte-like* com capacidade de colonizar o fígado após lesão aguda e funcionam de forma análoga aos hepatócitos maduros. Porém, existem duas limitações principais com a sua utilização. Por um lado, a sua aquisição envolve a destruição de embriões, levantando fortes questões éticas que restringiram o progresso da investigação destas células. Por outro lado, existe o problema da incompatibilidade imunológica, entre os dadores e os recipientes, no transplante de ESC (Zacharias et al., 2011). Swijnenburg et al. (Swijnenburg et al., 2008) demonstraram que as ESC transplantadas são muito imunogénicas, desencadeiam respostas imunes celulares e humorais robustas e, como resultado, são rapidamente rejeitadas pelo recetor. Apesar destes inconvenientes, a investigação à volta destas células continua em movimento (Zacharias et al., 2011). Neste sentido, um estudo realizado em 2015 (Tolosa et al., 2015), revelou a diferenciação eficiente das ESC em hepatócitos neonatais, em ratos com toxicidade induzida por paracetamol, capazes de repopular o fígado *in vivo* com a restauração da função hepática.

As *induced pluripotent stem cells* (iPSC) são semelhantes às ESC na medida em que são pluripotentes e autorrenovam-se. Estas células são produzidas *in vitro* a partir de células somáticas, evitando o uso de tecidos embrionários e, deste modo, os problemas éticos. Por outro lado, possibilitam a utilização autóloga, ultrapassando o problema da rejeição alogénica. Os fibroblastos são a principal fonte mas, também podem ser obtidas a partir de outras células somáticas como os hepatócitos. As células estaminais derivadas dos hepatócitos são mais propícias à formação de teratomas do que as células provenientes de outras origens. A capacidade de diferenciação destas células é independente da origem somática porém, é altamente dependente da técnica de reprogramação das mesmas. Para induzir pluripotência existem diferentes técnicas, como a utilização de vetores virais. Este método é limitado pela possibilidade de reativação espontânea dos genes virais e pela sua integração no genoma do hospedeiro com risco de formação de tumores. Atualmente as iPSC podem ser obtidas a partir de vetores que não se integram no genoma do hospedeiro. As células obtidas, os *hepatocyte-like*, partilham as mesmas propriedades que os hepatócitos mas, não são tão maduras funcionalmente. Outra limitação é a falta de um sistema eficiente de produção destas células em larga escala para a aplicação clínica (Behshad Pournasr & Duncan, 2017). Os autores Zhu et al. foram capazes de diferenciar hepatócitos a partir de fibroblastos humanos através de células estaminais multipotentes, em vez de pluripotentes, encurtando o protocolo de reprogramação. Através do bloqueio da pluripotência, foi prevenida a formação de tumores (Zhu et al., 2014).

Num estudo realizado pelos autores Chen et al., iPSC obtidas a partir de fibroblastos humanos da pele, foram diferenciadas em células *hepatocyte-like in vitro* e, posteriormente, transplantadas para um modelo animal que mimetiza a SCN1 humana, o rato Gunn. Estas células expressaram o gene UGT1A1 e substituíram 2.5 a 7.5% da massa hepática dos ratos, levando a uma redução da bilirrubina sérica até 24 semanas após o transplante (Y. Chen et al., 2015).

Em 2018, *mesenchymal stem cell-derived from induced pluripotent stem cells* (iMSCs) foram transplantadas para o fígado do rato Gunn após hepatectomia parcial e demonstraram um enxerto eficiente após 2 meses, assim como uma melhoria parcial da hiperbilirrubinémia (Spitzhorn et al., 2018).

As *human liver stem cells* (HLSC) são uma população de células estaminais isoladas a partir de hepatócitos criopreservados. Estas células têm uma alta propensão para se diferenciarem em células *hepatocyte-like* e não requerem manipulação genética durante a sua produção. Atualmente, estão a ser utilizadas num ensaio clínico de fase I na AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco), aprovado em crianças com doenças hereditárias do metabolismo hepático. As HLSC são reconhecidas pela Agência Europeia do Medicamento como uma potencial terapêutica para doenças do ciclo da ureia e insuficiência hepática aguda, oferecendo uma oportunidade no tratamento de outras doenças metabólicas como a SCN1 (Famulari et al., 2020).

Para testar a eficácia destas células no tratamento da SCN1, foi induzida a diferenciação e maturação de HLSC no fígado de ratos deficientes para o gene UGT1A1, com o objetivo de validar se estas eram capazes de expressar o gene em falta. O estado altamente proliferativo do fígado em animais jovens, aumenta a eficácia da terapia celular no período neonatal e pediátrico e previne eventuais danos tecidulares impossíveis de corrigir mais tarde. Por este motivo, as HLSC foram injetadas no quinto dia do período pós-natal. Os resultados deste estudo mostraram que uma injeção única de HLSC permitiu a expressão do gene UGT1A1 *in vivo*, induziu uma diminuição da bilirrubina não conjugada e melhorou o fenótipo e a sobrevivência dos ratos tratados. Como os neurónios são sensíveis à hiperbilirrubinémia, foi analisado o cerebelo e o hipocampo dos ratos para pesquisa de lesões cerebrais. Surpreendentemente, houve uma redução dos neurónios lesados no hipocampo e no cerebelo dos ratos, refletindo a eficácia das HLSC na prevenção dos efeitos neurológicos da bilirrubina não conjugada, quando injetadas em ratos recém-nascidos. Este tipo de terapêutica está maioritariamente em fase pré-clínica, tornando fundamental a avaliação posterior da segurança, potencial toxicidade e carcinogénese em modelos animais *in vivo* antes da sua utilização na prática clínica. Por outro lado, os resultados obtidos neste estudo são a curto prazo, pelo que estudos futuros a longo prazo são necessários para investigar se injeções múltiplas de HLSC conseguirão diminuir a hiperbilirrubinémia não conjugada, nestes modelos animais, de forma duradoura (Famulari et al., 2020).

Um estudo recente, utilizou *heterologous human adult liver-derived progenitor cells* (HHALPCs) em doentes com SCN1 num ensaio de fase I/II. Durante o período de tratamento, os doentes foram sujeitos a fototerapia diária. As HHALPCs induziram uma

descida de cerca de 20% da bilirrubina em 2 doentes e noutro doente foi observado um efeito transitório (Smets et al., 2019).

O transplante de células estaminais em doenças metabólicas hepáticas pode servir como uma ponte para o transplante hepático, oferecendo igualmente a potencial correção a longo prazo do défice metabólico. As principais limitações do transplante de hepatócitos são a quantidade limitada de dadores e a possibilidade de rejeição alogénica. Esta última pode ser evitada com o transplante autólogo. No entanto, isto apenas seria possível através da obtenção de um número suficiente de hepatócitos autólogos através de ressecção hepática. Este problema pode ser ultrapassado através da utilização de iPSC. Estas células são geradas *in vitro* através de terapia génica em 4 a 5 meses e, são depois diferenciadas e utilizadas para transplante (Behshad Pournasr & Duncan, 2017).

Antes destas terapias estarem preparadas para a aplicação clínica, é necessário ultrapassar vários problemas como a eficiente diferenciação das células estaminais em hepatócitos maduros, que idealmente deverá ser possível sem a utilização de vetores virais, ou alterações nos reguladores do ciclo celular para evitar a formação de tumores. Isto deve ser acompanhado por um método de produção rápido, em larga escala e de alta qualidade de células para transplante. Além disso, antes da aplicação clínica, estas técnicas devem ser testadas e provadas eficazes em modelos animais de grande porte porque são melhores preditores da resposta em humanos face aos roedores (Nicolas et al., 2016).

3.5 Terapia Génica

Na última década, a terapia génica, ao fornecer cópias funcionantes de genes, emergiu como uma alternativa promissora ao transplante nas doenças hepáticas monogénicas. A terapia génica pode ser aplicada *in vitro* ou *in vivo*. Na metodologia *in vivo* utiliza-se um vetor para transportar o gene para as células alvo do doente. No método *in vitro*, as células alvo são geneticamente modificadas, fora do corpo, após serem isoladas do doente e, são posteriormente reintroduzidas no doente por transplante autólogo. As principais vantagens deste método são a atenuação das respostas imunes e a prevenção da propagação do vetor para outros tecidos como as gónadas e, consequentemente, a evicção da transmissão germinal. Porém, o número reduzido de

células que podem ser modificadas torna esta abordagem, atualmente, limitada à correção de células estaminais hematopoiéticas (Van Dijk et al., 2015). O método de transporte dos genes é importante e o vetor ótimo para a terapia gênica hepática *in vivo* deve ser capaz de transferir genes para uma grande quantidade de hepatócitos, com pouca toxicidade associada (Brunetti-Pierri, 2008).

Apesar do número de vetores para a terapia gênica hepática estar constantemente a crescer, existem 5 principais classes: retrovírus, lentivírus, adenovírus, *helper-dependent adenoviral* (HDAd) e adeno-associated virus (AAV) (Baruteau et al., 2017).

Os retrovírus foram os primeiros vetores utilizados na terapia gênica. Conseguem facilmente integrar-se na cromatina de células alvo mitoticamente ativas para uma transdução eficaz. Por consequência, é necessário induzir a divisão celular através de várias técnicas como a hepatectomia parcial ou a adição do fator de crescimento dos hepatócitos. Uma grande vantagem destes vírus é a capacidade de acomodar grandes genes com mais de 14 kpb. O risco elevado de mutagênese é ainda um dos principais problemas associados a esta classe de vetores (Brunetti-Pierri, 2008).

Os lentivírus apresentam vantagens semelhantes aos retrovírus, todavia não requerem que as células alvo estejam mitoticamente ativas para acederem ao seu genoma e há evidências que o risco de mutagênese é inferior. A maioria das células afetadas por este vetor são as não parenquimatosas, pelo que a sua eficácia ao nível dos hepatócitos é relativamente baixa (Baruteau et al., 2017). Os autores Seppen et al. demonstraram que a injeção destes vetores contendo o gene UGT1A1 no rato Gunn, alcançou apenas uma correção transitória da bilirrubina (Seppen et al., 2006).

Os adenovírus são vírus de DNA de cadeia dupla, não encapsulado, capazes de atuar em células divisíveis ou indivisíveis. Em modelos animais demonstraram um forte tropismo hepático. A grande desvantagem desta classe vetorial é a capacidade de provocar uma resposta imune inata mediada por células T citotóxicas com consequente destruição das células alvo afetadas pelos vírus. Isto pode ser explicado por uma predisposição genética ou por uma resposta imune de memória causada por uma exposição prévia ao vírus (Baruteau et al., 2017). A indução de tolerância apresenta-se como uma boa opção para limitar estas respostas imunes, nomeadamente através do bloqueio transitório das mesmas utilizando imunossuppressores. Outra abordagem para ultrapassar a rejeição imune é a deleção de regiões codificantes dos vírus responsáveis pela resposta imunitária

ao mesmo. Por outro lado, a expressão de proteínas imunomoduladoras, como a CTLA4, capazes de inibir os mecanismos estimuladores entre as células apresentadoras de antígenos e as células efectoras, é outra opção válida (Miranda & Bosma, 2009).

Os vetores HDAd são a nova geração de adenovírus e são desprovidos de todos os genes virais, oferecendo um perfil de segurança superior com uma resposta imune inata reduzida e ausência de toxicidade crônica. Não obstante, tal como os adenovírus de primeira geração, também eles podem desencadear uma reação aguda pela ativação do sistema imune inato do hospedeiro, quando administrados sistemicamente em altas doses. Esta toxicidade aguda é, atualmente, o maior obstáculo da aplicação clínica desta classe vetorial e várias estratégias estão em investigação para ultrapassar este problema (Ronzitti et al., 2016).

Os vetores AAV são vírus não patogênicos de DNA de cadeia simples, pertencentes à família *Parvoviridae*, que requerem a coinfeção com outro vírus auxiliar para se replicarem. Na ausência deste segundo vírus, o AAV integra-se nas células alvo e estabelece uma infecção latente. Tal como os adenovírus, estes vetores são capazes de atuar em células divisíveis ou indivisíveis. Por outro lado, existem diversos subtipos e é a cápside viral que determina o tropismo celular através da interação de recetores de superfície e intracelulares. Desde 2004, os AAV emergiram como os principais candidatos para a terapia génica nas doenças monogénicas hepáticas, como a SCN1. Comparativamente aos adenovírus, esta classe vetorial desencadeia uma resposta imune menos robusta após a administração *in vivo* (McCarty et al., 2004).

Contudo, os autores Mingozzi et al. (Mingozzi et al., 2007) documentaram uma resposta de células T CD8⁺ contra a cápside dos AAV em humanos. Isto acontece porque indivíduos saudáveis apresentam células T CD8⁺ de memória específicas para a cápside dos AAV. Consequentemente, quando estes vetores são utilizados na terapia génica, ocorre uma reativação e expansão destas células imunes, ao qual sucede uma rejeição dos hepatócitos transduzidos.

Existem várias abordagens cujo objetivo é superar as respostas imunes indesejadas, tais como, a modificação de epítomos específicos na cápside viral. Vários protocolos envolvendo uma imunossupressão transitória foram igualmente propostos em modelos animais e humanos. A principal preocupação deste vetor é o risco de mutagénese em humanos, embora não tenha sido completamente comprovado em modelos animais.

Apesar de terem sido realizados mais de 170 ensaios clínicos em humanos, com base em vetores AAV aprovados, nenhum tumor foi relatado à data (McCarty et al., 2004).

No entanto, nem todos os doentes são candidatos para esta abordagem. A presença de anticorpos neutralizantes (NAbs – neutralizing antibodies) surge após a exposição a um AAV *wild-type* e pode comprometer a transdução eficiente do gene *in vivo* após a administração do vetor AAV recombinante. Os NAbs são apenas uma pequena parte de todos os anticorpos anti-AAV (Aronson et al., 2019). A prevalência destes anticorpos contra os diferentes subtipos de AAV é muito importante para a sua aplicabilidade como vetor de terapia génica. Os autores Montenegro-Miranda et al. (Montenegro-Miranda et al., 2013) evidenciaram que a prevalência destes anticorpos, na população em geral, para os serotipos 1 e 2 do AAV é muito alta e para os serotipos 5, 8 e 9 é muito baixa.

A influência dos NAbs nos resultados da terapia génica mediada por AAV não é completamente elucidada. Algumas observações, mostraram que pequenas quantidades de NAbs anti-AAV diminuem a transdução do vetor. No entanto, baixos títulos de NAbs podem ser ultrapassados parcialmente pelo aumento da dose de AAV administrada. No entanto, são necessárias outras estratégias para ultrapassar os efeitos negativos dos NAbs em doentes com títulos elevados dos mesmos. Uma destas técnicas baseia-se na eliminação dos NAbs anti-AAV circulantes por plasmaferese antes da administração do vetor recombinante. Foi demonstrado que ciclos sequenciais de plasmaferese, podem levar a uma redução substancial ou mesmo à depleção dos anticorpos. Não obstante, a elevação rápida de NAbs após uma administração única do vetor, torna esta tecnologia inútil em futuras administrações do mesmo. Neste sentido, o bloqueio farmacológico da formação dos anticorpos poderá ser uma opção mais viável. Por outro lado, a formulação da preparação do vetor foi identificada como um fator modulador crucial. Deste modo, o aumento de cápsides vazias na preparação de AAV recombinante, reduz os efeitos negativos dos NAbs na sua transdução (Aronson et al., 2019).

Atualmente, nem todos os doentes com SCN são candidatos para esta abordagem terapêutica pela pré-existência de anticorpos, no contexto de imunidade natural aos AAV. Num estudo realizado em 2019 (Aronson et al., 2019), foi investigada a implicação clínica de baixos títulos de NAbs na transdução hepática por vetores AAV, para determinar se doentes com SCN com estas características poderiam ser candidatos para terapia génica. Em 15 dos 29 participantes do estudo, foram detetados NAbs anti-AAV8 com títulos que

variavam entre os 1:1 e os 1:1000. A maioria dos indivíduos tinha títulos inferiores a 1:100 e apenas 3 tinham 1:1000. Os indivíduos seropositivos para anti-AAV8 também apresentavam NAb anti-AAV5, exceto em 3 doentes, apesar dos títulos dos anti-AAV5 serem inferiores aos dos anti-AAV8. Como expectável e baseado na alta prevalência de anti-AAV2 na população em geral, todos os doentes com anti-AAV8, também tinham anti-AAV2 cujos títulos eram superiores aos dos anti-AAV8. Este estudo concluiu que títulos baixos de anticorpos, encontrados no contexto de imunidade natural aos AAV, podem ser ultrapassados pela administração de preparações com cápsides vazias, oferecendo uma alternativa para tratar um subgrupo de doentes seropositivos *borderline*.

No rato Gunn, o AAV1 providenciou uma correção eficiente dos níveis séricos de bilirrubina. No entanto, a alta prevalência de NAb contra o mesmo, torna-o inadequado para a administração sistémica na maioria dos doentes com SCN1. Por este motivo, os serotipos 5, 8 e 9 apresentam-se promissores para a terapia génica na SCN1. Para além disto, o AAV5 e AAV8 têm uma transdução hepática muito eficiente em primatas, tornando-os nos candidatos favoritos para a terapia génica *in vivo* em doentes com SCN1. É importante referir que para um segundo tratamento pode ser necessária a utilização de um serotipo de vetor AAV diferente porque a eficácia do serotipo inicial é perdida pela geração de NAb contra o mesmo (Miranda & Bosma, 2009).

Num estudo efetuado em 2013, demonstrou-se que a injeção intraportal de AAV1 e AAV8 no rato Gunn, resultou em altas expressões de UGT1A1 e na correção terapêutica da hiperbilirrubinémia. Em contraste com estes 2 serotipos, a eficácia do AAV5 neste modelo animal, foi muito baixa. Além disso, os vetores AAV1 e AAV2 demonstraram um forte tropismo hepático, enquanto que o AAV5 apresentou um tropismo tecidual mais amplo. Estes resultados podem ser explicados pela diferente afinidade dos recetores celulares dos diferentes serotipos. Este estudo confirmou que o vetor AAV5 teve um desempenho ineficaz no fígado do rato Gunn, tornando-o inadequado para estudos neste modelo animal (Montenegro-Miranda et al., 2013).

Num estudo realizado pelos autores Greig et al. (Greig et al., 2018), um vetor AAV8 que expressava o gene humano UGT1A1 foi administrado em macacos. Todos os macacos sobreviveram até à necropsia programada no 56º dia e não mostraram quaisquer anomalias clínicas durante o estudo. O gene foi expresso com sucesso em cerca de 37% dos hepatócitos sem toxicidade *major* hepática. A administração do vetor desencadeou

uma resposta imune, mediada por células T, contra o gene UGT1A1, maioritariamente restrita a células T residentes em tecidos e não no sangue. Este estudo demonstrou a importância de estudar as respostas imunes no local de transdução do gene e a utilidade limitada do sangue para avaliar estas respostas restritas às células T nos tecidos.

Os autores Bortolussi et al. (Bortolussi et al., 2012) demonstraram que uma injeção única de vetores AAV9 que expressavam o gene UGT1A1 humano, em ratos recém-nascidos mutantes, foi bem-sucedida com sobrevivência dos modelos animais até à idade adulta sem nenhuma alteração neurológica. Estes resultados são muito promissores porque mostram que a expressão neonatal do gene UGT1A1 através deste vetor, leva à sobrevivência dos animais com uma importante redução dos níveis plasmáticos da bilirrubina e desenvolvimento normal do sistema nervoso.

Existem ainda vetores não virais, desenvolvidos como uma alternativa aos vetores virais. Este tipo de vetores pode envolver a utilização de força física de modo a aumentar a permeabilidade da membrana celular e permitir a entrada do gene pretendido na célula, destacando-se o método de injeção hidrodinâmica. Estes métodos têm o inconveniente de provocarem danos tecidulares. Por outro lado, os vetores não virais podem envolver a utilização de transportadores, preparados a partir de compostos sintéticos ou naturais, para a entrega do gene no interior da célula. Estes últimos incluem lipossomas e proteínas sintéticas. Os vetores não virais oferecem várias vantagens face aos virais, tais como, baixa imunogenicidade, produção fácil e ausência de restrições ao tamanho do gene transportado (Brunetti-Pierri, 2008). Apesar disto, apresentam uma capacidade limitada em obter resultados duradouros na expressão do gene quando comparados com a eficácia de transdução dos vetores virais, que têm a habilidade de ultrapassar as barreiras celulares e os mecanismos de defesa imune. Por estes motivos, as atuais abordagens não virais permanecem bastante limitadas. Contudo, nas últimas décadas, estas partículas têm demonstrado particular importância para a terapia génica pela sua biocompatibilidade e excelente potencial para produção em larga escala (Miranda & Bosma, 2009).

Um dos principais entraves à aplicação clínica da terapia génica é o valor limitado dos modelos animais na extrapolação dos efeitos nos humanos. Existem diversas razões para justificar esta afirmação, particularmente, ao contrário dos animais, os humanos são expostos a infeções por AAV ao longo da vida gerando células T memória que reativam aquando da exposição a este vetor, gerando reações agudas não previstas em modelos

animais (Pien et al., 2009). Adicionalmente, foi observada uma taxa de 80% de carcinoma hepatocelular em modelos de rato injetados com AAV2 e AAV8, cuja integração ocorreu num locus específico dos roedores ausente noutros vertebrados. Os padrões de expressão dos genes no fígado diferem consoante as espécies, sendo difícil de extrapolar de forma confiável vetores de humanos a partir de estudos em animais (Chandler et al., 2015).

A SCN1 tem sido um paradigma para o desenvolvimento da terapia génica por diversas razões, nomeadamente, o defeito subjacente está bem caracterizado do ponto de vista bioquímico e molecular; a fração de hepatócitos necessária para obter um benefício clínico é pequena; existe um modelo animal que mimetiza a doença humana, o rato Gunn; e os resultados das terapias experimentais podem ser facilmente validados pela medição dos níveis séricos e biliares de bilirrubina. Por estes motivos, a SCN1 é muito atrativa como candidata para a terapia génica e a sua cura tem sido o objetivo de vários estudos que usaram as 5 classes diferentes de vetores (Ronzitti et al., 2016). No rato Gunn, os retrovírus alcançaram uma correção a longo prazo da hiperbilirrubinémia; os lentivírus atingiram uma redução estável dos níveis de bilirrubina perto dos valores normais por um período superior a 1 ano após o tratamento; os HDAd obtiveram uma correção duradoura da hiperbilirrubinémia com toxicidade crónica negligenciável; o AAV1 foi muito eficiente na correção da hiperbilirrubinémia, embora tenha desencadeado lesões hepáticas lipídicas macroscópicas de etiologia desconhecida nos animais; e uma redução da hiperbilirrubinémia também foi observada após injeção hidrodinâmica (Brunetti-Pierri, 2008).

A terapia génica na SCN1 como alternativa ou adjuvante terapêutica é importante, tendo em conta as limitações com as modalidades terapêuticas atualmente disponíveis. No entanto, cada um dos vetores apresenta vantagens e desvantagens e novas metodologias precisam de ser investigadas para melhorar o perfil de segurança destes vetores. Apesar destas limitações, a terapia génica pode tornar-se, em breve, numa realidade clínica nas doenças do metabolismo hepático (Baruteau et al., 2017).

A aplicação pediátrica da terapia génica tem várias vantagens, como a prevenção da morte precoce e sequelas neurológicas irreversíveis e a prevenção das respostas imunes, uma vez que os recém-nascidos têm um sistema imunológico imaturo e as crianças pequenas têm baixas taxas de anticorpos contra os AAV. Uma dificuldade associada à terapia génica no fígado prende-se com a provável perda progressiva do genoma vetorial

ao longo do tempo. O fígado humano adulto é 16 vezes maior que o de um recém-nascido. Deste modo, é pouco provável que uma injeção neonatal do gene através do vetor seja suficiente para fornecer a correção do déficit metabólico ao longo de toda a vida daquele indivíduo. Nestas situações, existe a necessidade de uma nova injeção durante a fase rápida de crescimento hepático (R. McKay et al., 2011).

A terapia génica dirigida ao músculo foi desenvolvida para algumas doenças do metabolismo hepático, no sentido de contornar alguns problemas da injeção sistémica, que é a via mais comum na terapia génica hepática. As principais vantagens são a biodistribuição limitada com consequente redução do risco de transmissão germinativa, a exposição mínima aos anticorpos circulantes e a necessidade de uma dose inferior de vetor para atingir um efeito semelhante. No entanto, para obter o efeito desejado, poderão ser necessárias centenas de injeções intramusculares, tornando esta abordagem impraticável (Baruteau et al., 2017).

Existe uma clara necessidade urgente de terapias mais eficientes em muitas doenças hepáticas monogénicas graves, que exige uma cuidadosa análise de risco-benefício, especialmente em pediatria. É provável que a terapia génica se torne uma opção para o tratamento de rotina de algumas doenças metabólicas hepáticas a curto prazo. Os vetores AAV são os principais candidatos. As tecnologias de transferência de genes estão a alcançar um limiar entusiasmante de eficácia e prometem revolucionar a gestão de muitas doenças atualmente incuráveis. Apesar dos vários desafios clínicos e económicos de produção permanecerem, esta abordagem gerou um grande interesse no tratamento de doenças gravemente debilitantes (Brunetti-Pierri, 2008).

4. Conclusão

Há alguns anos, a hiperbilirrubinemia não conjugada grave levava, frequentemente, a danos cerebrais irreversíveis nos doentes com SCN1. O único tratamento disponível na altura eram as transfusões sanguíneas, associadas a mortalidade e morbilidade significativas. A introdução da fototerapia, no início do anos 60, providenciou uma alternativa mais segura, permitindo o tratamento a longo prazo desta doença. Apesar de muito eficaz, a fototerapia tem algumas desvantagens. A fototerapia necessária na SCN1 pode durar até 16 horas por dia e, mesmo assim, falha na prevenção dos danos cerebrais em aproximadamente 25% dos doentes. Estas considerações levaram à exploração de estratégias terapêuticas alternativas para o tratamento desta síndrome.

Atualmente, o transplante hepático é o único tratamento curativo para esta doença. Contudo não é desprovido de limitações e complicações significativas. O transplante de hepatócitos demonstrou uma eficácia transitória, porém, a sua implementação na prática clínica é dificultada pelas limitações técnicas e práticas. A identificação de uma fonte de hepatócitos para o transplante é um grande desafio, assim como a otimização da sua qualidade e armazenamento. Além disso, o transplante de hepatócitos tem alguns inconvenientes, como o efeito terapêutico transitório que limita a durabilidade do resultado a menos de 1 ano na maioria dos casos; a incapacidade de monitorizar a função das células enxertadas; e a rejeição que resulta em morte das células pós-infusão e na necessidade de imunossupressão prolongada.

O transplante de células estaminais é uma alternativa promissora ao transplante de hepatócitos. As células estaminais podem ser geradas a partir de células somáticas e têm sido usadas, experimentalmente, para tratar doenças metabólicas hepáticas, como a SCN1. A investigação neste campo ainda é muito recente e o transplante de células estaminais pode, no futuro, ser usado como uma ponte para o transplante hepático ou como um mecanismo de regeneração hepática. No entanto, é fundamental o desenvolvimento de protocolos eficientes de diferenciação e produção destas células e a demonstração da sua segurança, antes da sua aplicação na prática clínica.

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidas várias estratégias de terapia génica com vetores virais e não virais. Foi demonstrado que esta abordagem pode resultar na correção a longo prazo da hiperbilirrubinemia não conjugada em modelos animais experimentais

da SCN1. Todavia, ainda se encontra numa fase embrionária nos humanos. A terapia génica *in vivo* através de vetores AAV8 é muito promissora e está, atualmente, a ser estudada em doentes com SCN1. Se for bem sucedida, poderá melhorar decisivamente a vida dos doentes e das suas famílias.

Agradecimentos

A conclusão deste trabalho só foi possível com a ajuda de um conjunto de pessoas que sempre me apoiaram e ajudaram a alcançar os meus objetivos.

Em primeiro lugar quero agradecer à Dr^a Cristina Campos Gonçalves pela orientação, motivação, ensinamentos, disponibilidade e dedicação que sempre me transmitiu nesta etapa do meu percurso académico.

Deixo um grande agradecimento aos meus pais e irmão por me terem apoiado ao longo de todo este tempo e por terem acreditado em mim desde sempre. Sem todos os esforços e sacrifícios que fizeram certamente nunca conseguiria ter chegado tão longe.

Aos meus amigos de longa data, pela camaradagem e apoio que deram. Passámos bons momentos juntos que serviram sempre de motivação para ultrapassar os desafios que me foram surgindo.

Aos meus amigos e colegas de curso que também participaram nesta caminhada comigo. A motivação dada contribuiu para que este projeto se concretizasse de uma forma mais fácil.

Quero finalmente agradecer a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a minha evolução pessoal e profissional.

Um sincero obrigado a todos.

Bibliografia

- Ambrosino, G., Varotto, S., Strom, S. C., Guariso, G., Franchin, E., Miotto, D., Caenazzo, L., Basso, S., Carraro, P., Valente, M. L., D'Amico, D., Zancan, L., & D'Antiga, L. (2005). Isolated hepatocyte transplantation for Crigler-Najjar syndrome type 1. *Cell Transplantation*, 14(8), 151–157. <https://doi.org/10.3727/000000005783983250>
- Aronson, S. J., Veron, P., Collaud, F., Hubert, A., Delahais, V., Honnet, G., De Knecht, R. J., Junge, N., Baumann, U., Di Giorgio, A., D'Antiga, L., Ginocchio, V. M., Brunetti-Pierri, N., Labrune, P., Beuers, U., Bosma, P. J., & Mingozzi, F. (2019). Prevalence and Relevance of Pre-Existing Anti-Adeno-Associated Virus Immunity in the Context of Gene Therapy for Crigler-Najjar Syndrome. *Human Gene Therapy*, 30(10), 1297–1305. <https://doi.org/10.1089/hum.2019.143>
- Baruteau, J., Waddington, S. N., Alexander, I. E., & Gissen, P. (2017). Gene therapy for monogenic liver diseases: clinical successes, current challenges and future prospects. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 40(4), 497–517. <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0053-3>
- Behshad Pournasr, & Duncan, S. A. (2017). Modeling inborn errors of hepatic metabolism using induced. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 37(11), 1994–1999. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA>
- Bortolussi, G., Zentilin, L., Baj, G., Giraudi, P., Bellarosa, C., Giacca, M., Tiribelli, C., & Muro, A. F. (2012). Rescue of bilirubin-induced neonatal lethality in a mouse model of Crigler-Najjar syndrome type I by AAV9-mediated gene transfer. *The FASEB Journal*, 26(3), 1052–1063. <https://doi.org/10.1096/fj.11-195461>
- Brunetti-Pierri, N. (2008). Gene therapy for inborn errors of liver metabolism: Progress towards clinical applications. *Italian Journal of Pediatrics*, 34(2), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1824-7288-34-2>
- Celik, N., Squires, J. E., Soltys, K., Vockley, J., Shellmer, D. A., Chang, W., Strauss, K., McKiernan, P., Ganoza, A., Sindhi, R., Bond, G., Mazariegos, G., & Khanna, A. (2019). Domino liver transplantation for select metabolic disorders: Expanding the living donor pool. *JIMD Reports*, 48(1), 83–89. <https://doi.org/10.1002/jmd2.12053>
- Chandler, R. J., La Fave, M. C., Varshney, G. K., Trivedi, N. S., Carrillo-Carrasco, N., Senac, J. S., Wu, W., Hoffmann, V., Elkahoun, A. G., Burgess, S. M., & Venditti, C. P. (2015). Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *Journal of Clinical Investigation*, 125(2), 870–880. <https://doi.org/10.1172/JCI79213>
- Chen, H. L., Wu, S. H., Hsu, S. H., Liou, B. Y., Chen, H. L., & Chang, M. H. (2018). Jaundice revisited: Recent advances in the diagnosis and treatment of inherited cholestatic liver diseases. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0475-8>
- Chen, Y., Li, Y., Wang, X., Zhang, W., Sauer, V., Chang, C. J., Han, B., Tchaikovskaya, T., Avsar, Y., Tafaleng, E., Madhusudana Girija, S., Tar, K., Polgar, Z., Strom, S., Bouhassira, E. E., Guha, C., Fox, I. J., Roy-Chowdhury, J., & Roy-Chowdhury, N. (2015). Amelioration of

- Hyperbilirubinemia in Gunn Rats after Transplantation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocytes. *Stem Cell Reports*, 5(1), 22–30.
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.04.017>
- Dhawan, A., Lawlor, M. W., Mazariegos, G. V., McKiernan, P., Squires, J. E., Strauss, K. A., Gupta, D., James, E., & Prasad, S. (2019). Disease burden of Crigler–Najjar syndrome: Systematic review and future perspectives. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*.
<https://doi.org/10.1111/jgh.14853>
- Dhawan, A., Mitry, R. R., & Hughes, R. D. (2006). Hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29(2), 431–435.
<https://doi.org/10.1007/s10545-006-0245-8>
- Ebrahimi, A., & Rahim, F. (2017). Crigler-Najjar Syndrome: Current Perspectives and the Application of Clinical Genetics. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 18(3), 201–211. <https://doi.org/10.2174/1871530318666171213153130>
- Fagioli, S., Daina, E., D'Antiga, L., Colledan, M., & Remuzzi, G. (2013). Monogenic diseases that can be cured by liver transplantation. *Journal of Hepatology*, 59(3), 595–612.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.04.004>
- Famulari, E. S., Navarro-Tableros, V., Herrera Sanchez, M. B., Bortolussi, G., Gai, M., Conti, L., Silengo, L., Tolosano, E., Tetta, C., Muro, A. F., Camussi, G., Fagoonee, S., & Altruda, F. (2020). Human liver stem cells express UGT1A1 and improve phenotype of immunocompromised Crigler Najjar syndrome type I mice. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-57820-2>
- Fox, I. J., Chowdhury, J. R., Kaufman, S. S., Goertzen, T. C., Chowdhury, N. R., Warkentin, P. I., Dorko, K., Sauter, B. V., & Strom, S. C. (1998). Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *New England Journal of Medicine*, 338(20), 1422–1426. <https://doi.org/10.1056/NEJM199805143382004>
- Greig, J. A., Calcedo, R., Kuri-Cervantes, L., Nordin, J. M. L., Albrecht, J., Bote, E., Goode, T., Chroscinski, E. A., Bell, P., Richman, L. K., Betts, M. R., & Wilson, J. M. (2018). AAV8 Gene Therapy for Crigler-Najjar Syndrome in Macaques Elicited Transgene T Cell Responses That Are Resident to the Liver. *Molecular Therapy: Methods and Clinical Development*, 11(12), 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.10.012>
- Guerrero-Fernández, J. Cartón Sánchez, A. Barreda Bonis, A. Menéndez Suso, J. Ruiz Dominguez, J. (2018). *Manual de Diagnóstico y Terapéutica en Pediatría*.
- Karimzadeh, P., Fallahi, M., Kazemian, M., & Al., E. (2020). Bilirubin Induced Encephalopathy. *Iranian Journal of Child Neurology*, 14(1), 7–19.
- Khanna, A., Hart, M., Nyhan, W., Hassanein, T., Panyard-Davis, J., & Barshop, B. (2006). Domino Liver Transplantation in Maple Syrup Urine Disease. *Liver Transplantation*, 12(5), 876–882. <https://doi.org/10.1002/lt>
- McCarty, D. M., Young, S. M., & Samulski, R. J. (2004). Integration of Adeno-Associated Virus (AAV) and Recombinant AAV Vectors. *Annual Review of Genetics*, 38(1), 819–845.
<https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.143717>
- Mingozzi, F., Maus, M. V., Hui, D. J., Sabatino, D. E., Murphy, S. L., Rasko, J. E. J., Ragni, M. V.,

- Manno, C. S., Sommer, J., Jiang, H., Pierce, G. F., Ertl, H. C. J., & High, K. A. (2007). CD18+ T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nature Medicine*, 13(4), 419–422. <https://doi.org/10.1038/nm1549>
- Miranda, P. S. M., & Bosma, P. J. (2009). Towards Liver-Directed Gene Therapy for Crigler-Najjar Syndrome. *Current Gene Therapy*, 9(2), 72–82.
- Montenegro-Miranda, P. S., Pañeda, A., Bloemendaal, L. Ten, Duijst, S., De Waart, D. R., Gonzalez Aseguinolaza, G., & Bosma, P. J. (2013). Adeno-associated viral vector serotype 5 poorly transduces liver in rat models. *PLOS ONE*, 8(12), 8–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082597>
- Najimi, M., Defresne, F., & Sokal, E. M. (2016). Concise Review: Updated Advances and Current Challenges in Cell Therapy for Inborn Liver Metabolic Defects. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(8), 1117–1125. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0260>
- Nicolas, C., Wang, Y., Luebke-Wheeler, J., & Nyberg, S. L. (2016). Stem cell therapies for treatment of liver disease. *Biomedicines*, 4(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/biomedicines4010002>
- Oishi, K., Arnon, R., Wasserstein, M. P., & Diaz, G. A. (2017). Liver transplantation for pediatric inherited metabolic disorders: considerations for indications, complications, perioperative management. *Pediatr Transplant.*, 17(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Pien, G. C., Basner-Tschakarjan, E., Hui, D. J., Mentlik, A. N., Finn, J. D., Hasbrouck, N. C., Zhou, S., Murphy, S. L., Maus, M. V., Mingozi, F., Orange, J. S., & High, K. A. (2009). Capsid antigen presentation flags human hepatocytes for destruction after transduction by adeno-associated viral vectors. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1688–1695. <https://doi.org/10.1172/JCI36891>
- R. McKay, T., A. Rahim, A., M.K. Buckley, S., J. Ward, N., K.Y.Chan, J., J. Howe, S., & N. Waddington, S. (2011). Perinatal Gene Transfer to the Liver. *Current Pharmaceutical Design*, 17(24), 2528–2541. <https://doi.org/10.2174/138161211797247541>
- Rela, M., Muiesan, P., Vilca-melendez, H., Dhawan, A., & Baker, A. (1999). Auxiliary liver transplantation for Crigler Najjar syndrome type I-Original-Ann Surg 1999.pdf. *Annals of Surgery*, 229(4), 565–569.
- Ronzitti, G., Bortolussi, G., van Dijk, R., Collaud, F., Charles, S., Leborgne, C., Vidal, P., Martin, S., Gjata, B., Sola, M. S., van Wittenberghe, L., Vignaud, A., Veron, P., Bosma, P. J., Muro, A. F., & Mingozi, F. (2016). A translationally optimized AAV-UGT1A1 vector drives safe and long-lasting correction of Crigler-Najjar syndrome. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 3(7), 16049. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.49>
- Schauer, R., Lang, T., Zimmermann, A., Stangl, M., Da Silva, L., Schildberg, F. W., & Rau, H. G. (2002). Successful liver transplantation of two brothers with Crigler-Najjar syndrome type 1 using a single cadaveric organ. *Transplantation*, 73(1), 67–69. <https://doi.org/10.1097/00007890-200201150-00012>
- Schauer, R., Stangl, M., Lang, T., Zimmermann, A., Chouker, A., Gerbes, A. L., Schildberg, F. W., & Rau, H. G. (2003). Treatment of Crigler-Najjar type 1 disease: Relevance of early liver

- transplantation. *Journal of Pediatric Surgery*, 38(8), 1227–1231.
[https://doi.org/10.1016/S0022-3468\(03\)00273-2](https://doi.org/10.1016/S0022-3468(03)00273-2)
- Seppen, J., van Til, N. P., van der Rijt, R., Hiralall, J. K., Kunne, C., & Oude Elferink, R. P. J. (2006). Immune response to lentiviral bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene transfer in fetal and neonatal rats. *Gene Therapy*, 13(8), 672–677.
<https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302681>
- Shanmugam, N. P., Perumalla, R., Gopinath, R. G., Olithselvan, A., Varghese, J., Kapoor, D., & Rela, M. (2011). Auxiliary Liver Transplantation: A Form of Gene Therapy in Selective Metabolic Disorders. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 1(2), 118–120.
[https://doi.org/10.1016/S0973-6883\(11\)60132-1](https://doi.org/10.1016/S0973-6883(11)60132-1)
- Shanmuham, N., Valamparampil, J., Reddy, M., Al Said, K., Al-Thihli, K., Al-Hashmi, N., Al-Jishi, E., Ali Isa, H., Jalan, A., & Rela, M. (2018). Auxiliary Partial Orthotopic Liver Transplantation for Monogenic Metabolic Liver Diseases: Single-Centre Experience. *JIMD Reports*, 1(10), 73–78. <https://doi.org/10.1007/8904>
- Shi, X., Aronson, S., Khan, A. S., & Bosma, P. J. (2019). A novel UGT1A1 gene mutation causing severe unconjugated hyperbilirubinemia: A case report. *BMC Pediatrics*, 19(1), 1–3.
<https://doi.org/10.1186/s12887-019-1555-y>
- Smets, F., Dobbelaere, D., McKiernan, P., Dionisi-Vici, C., Broué, P., Jacquemin, E., Lopes, A. I., Gonçalves, I., Mandel, H., Pawlowska, J., Kamińska, D., Shteyer, E., Torre, G., Shapiro, R., Eyskens, F., Clapuyt, P., Gissen, P., Pariente, D., Grunewald, S., ... Sokal, E. (2019). Phase I/II Trial of Liver-derived Mesenchymal Stem Cells in Pediatric Liver-based Metabolic Disorders: A Prospective, Open Label, Multicenter, Partially Randomized, Safety Study of One Cycle of Heterologous Human Adult Liver-derived Progenitor Cells (Hepa. *Transplantation*, 103(9), 1903–1915. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002605>
- Sokal, E. M. (2014). Treating inborn errors of liver metabolism with stem cells: Current clinical development. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37(4), 535–539.
<https://doi.org/10.1007/s10545-014-9691-x>
- Spitzhorn, L. S., Kordes, C., Megges, M., Sawitza, I., Götze, S., Reichert, D., Schulze-Matz, P., Graffmann, N., Bohndorf, M., Wruck, W., Köhler, J. P., Herebian, D., Mayatepek, E., Oreffo, R. O. C., Häussinger, D., & Adjaye, J. (2018). Transplanted human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells support liver regeneration in gunn rats. *Stem Cells and Development*, 27(24), 1702–1714. <https://doi.org/10.1089/scd.2018.0010>
- Strauss, K. A., Ahlfors, C. E., Soltys, K., Mazareigos, G. V., Young, M., Bowser, L. E., Fox, M. D., Squires, J. E., McKiernan, P., Brigatti, K. W., Puffenberger, E. G., Carson, V. J., & Vreman, H. J. (2019). Crigler-Najjar Syndrome Type 1: Pathophysiology, Natural History, and Therapeutic Frontier. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.30959>
- Strauss, K. A., Robinson, D. L., Vreman, H. J., Puffenberger, E. G., Hart, G., & Morton, D. H. (2006). Management of hyperbilirubinemia and prevention of kernicterus in 20 patients with Crigler-Najjar disease. *European Journal of Pediatrics*, 165(5), 306–319.
<https://doi.org/10.1007/s00431-005-0055-2>
- Swijnenburg, R. J., Schrepfer, S., Govaert, J. A., Cao, F., Ransohoff, K., Sheikh, A. Y., Haddad, M., Connolly, A. J., Davis, M. M., Robbins, R. C., & Wu, J. C. (2008). Immunosuppressive

- therapy mitigates immunological rejection of human embryonic stem cell xenografts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(35), 12991–12996. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805802105>
- Sze, Y. K., Dhawan, A., Taylor, R. M., Bansal, S., Mieli-Vergani, G., Rela, M., & Heaton, N. (2009). Pediatric liver transplantation for metabolic liver disease: Experience at king's college hospital. *Transplantation*, 87(1), 87–93. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31818bc0c4>
- Tolosa, L., Caron, J., Hannoun, Z., Antoni, M., López, S., Burks, D., Castell, J. V., Weber, A., Gomez-Lechon, M. J., & Dubart-Kupperschmitt, A. (2015). Transplantation of hESC-derived hepatocytes protects mice from liver injury. *Stem Cell Research and Therapy*, 6(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0227-6>
- Van der Veere, C. N., Sinaasappel, M., McDonagh, A. F., Rosenthal, P., Labrune, P., Odievre, M., Fevery, J., Otte, J., McClean, P., Burk, G., Masakowsky, V., Sperl, W., Mowat, A. P., Mieli Vergani, G., Heller, K., Wilson, J. P., Shepherd, R., & Jansen, P. L. M. (1996). Current Therapy for Crigler-Najjar Syndrome Type 1 : Report of a World Registry management of patients with Crigler-Najjar syndrome. *Hepatology*, 24(2), 311–315.
- Van Dijk, R., Beuers, U., & Bosma, P. J. (2015). Gene Replacement Therapy for Genetic Hepatocellular Jaundice. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 48(2–3), 243–253. <https://doi.org/10.1007/s12016-014-8454-7>
- Vogel, K. R., Kennedy, A. A., Whitehouse, L. A., & Gibson, K. M. (2014). Therapeutic hepatocyte transplant for inherited metabolic disorders: Functional considerations, recent outcomes and future prospects. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37(2), 165–176. <https://doi.org/10.1007/s10545-013-9656-5>
- Zacharias, D. G., Nelson, T. J., Mueller, P. S., & Hook, C. C. (2011). The science and ethics of induced pluripotency: What will become of embryonic stem cells? *Mayo Clinic Proceedings*, 86(7), 634–640. <https://doi.org/10.4065/mcp.2011.0054>
- Zhu, S., Rezvani, M., Harbell, J., Mattis, A. N., Wolfe, A. R., Benet, L. Z., Willenbring, H., & Ding, S. (2014). Mouse liver repopulation with hepatocytes generated from human fibroblasts. *Nature*, 508(1), 93–97. <https://doi.org/10.1038/nature13020>